



TITLE:

分裂酵母CENP-CはCENP-Aの局在を制限する(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

須摩, 美智子

CITATION:

須摩, 美智子. 分裂酵母CENP-CはCENP-Aの局在を制限する. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13256>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	須摩 美智子
論文題目	分裂酵母CENP-CはCENP-Aの局在を制限する		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>セントロメアクロマチンにはヒストンH3のバリエーションであるCENP-Aが特異的に取り込まれる。CENP-Aを含むセントロメアクロマチン上には、有糸分裂期において、染色体分配に必須な動原体が構築される。多くの生物種において、セントロメアは各染色体に一箇所のみ存在し、そのサイズは厳密な制御を受けている。セントロメアを複数持つ染色体は、断裂や不均等分配を引き起こす。また、セントロメアが異所に形成される現象（ネオセントロメア）は、発達遅延や癌化の原因となる。セントロメアの塩基配列に生物種を超えた保存性はみられないことから、エピジェネティックなメカニズムによってCENP-Aがセントロメアに特異的に集積するものと予想されるが、その詳細は明らかではない。</p> <p>本研究では、分裂酵母を用いてCENP-A（分裂酵母Cnp1）の局在をセントロメアに限定する機構を解明することを目的とした。Cnp1の過剰発現下で、Cnp1の局在異常を示し、かつ温度感受性（制限温度36度、許容温度26度）を示す変異株をスクリーニングしたところ、動原体タンパク質であるCENP-C（分裂酵母Cnp3）の変異体（<i>cnp3-1</i>）が単離された。<i>cnp3-1</i>変異型遺伝子の塩基配列の解析により、Cnp3変異型タンパク質は、セントロメア結合ドメイン近傍の508番目のセリンがフェニルアラニンに置換していることが判明した。蛍光顕微鏡観察とクロマチン免疫沈殿法によって変異型Cnp3-1タンパク質の局在を解析したところ、Cnp1の発現レベルにかかわらず制限温度36℃で、その局在がセントロメアから消失することを確認した。この結果は、変異型Cnp3-1タンパク質のセントロメア結合能が低下していること示唆する。</p> <p>3本の染色体を有する分裂酵母野生型株では、セントロメアがクラスターを形成するため、Cnp1は核内に一点のフォーカスとして局在する。この特異的な局在は、Cnp1の過剰発現下でも変化しない。その一方で、<i>cnp3-1</i>変異株では、制限温度においてCnp1を過剰発現すると、Cnp1は複数のフォーカスとして観察された。この表現型は<i>cnp3+</i>遺伝子の欠失体とは異なることから、<i>cnp3-1</i>は機能欠損変異ではなく、何らかの機能を獲得した変異であると推察した。</p> <p>Mis18タンパク質は、Cnp1のセントロメアへのリクルート因子である。<i>mis18-818</i>変異の導入によりリクルート機能を抑制すると、遊離Cnp1が核内に増加する。<i>cnp3-1 mis18-818</i>二重変異株では、Cnp1は複数のフォーカスとして観察された。これらのフォーカスが核内に4点以上存在する場合もあること、また、Fish（Fluorescence in situ hybridization）法等によりセントロメアのクラスターは維持されていることが確認されたことから、<i>cnp3-1 mis18-818</i>二重変異株で観察されるCnp1のフォーカスは、Cnp1が非セントロメア領域に集積したことを示唆する。興味深いことに、変異型Cnp3-1タンパク質は、非セントロメア領域に集積したCnp1と共局在した。</p> <p>以上の結果より、変異型Cnp3-1は本来のセントロメアを認識する能力を失う一方、非セントロメア領域に取り込まれたCnp1と共局在し、その集積を安定化・増進することが示唆された。よって、野生型Cnp3タンパク質は、Cnp1の局在をセントロメア領域に限定させるエピジェネティックなメカニズムの一翼を担い、ネオセントロメアの形成を防止するものと結論した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

セントロメアクロマチンの際立った特徴は、ヒストンH3のバリエーションであるCENP-A（分裂酵母Cnp1）を含むことである。多くの生物種において、CENP-Aを含むヌクレオソームの存在領域は各染色体に一箇所限定され、そのサイズは厳密な制限を受ける。本学位論文は、セントロメアにおける

CENP-Aの分布を制限するメカニズムを分裂酵母を用いた遺伝学的手法により解明したものである。

Cnp1の高発現に感受性を示す分裂酵母変異体のスクリーニングの結果、動原体タンパク質CENP-C（分裂酵母Cnp3）をコードする*cnp3⁺*遺伝子の変異体(*cnp3-1*)を単離した。蛍光標識を施したCnp3タンパク質の細胞内観察、及びクロマチン免疫沈降法による結果より、変異型Cnp3タンパク質はセントロメアに対する結合能が低下していることを示した。次に、核内に遊離したCnp1が増加すると、*cnp3-1*変異体内では、Cnp1が複数のフォーカスとして観察されることを示した。この表現型は*cnp3⁺*遺伝子の欠失体では見られないことから、*cnp3-1*は機能欠損変異ではないと考えた。申請者は、*cnp3-1*変異体内で見られるフォーカスは、Cnp1の非セントロメア領域での集積によることを、遺伝学的手法、Fish法等により検証し、さらに、これらのフォーカスに変異型Cnp3タンパク質が共局在することを示した。

これら一連の結果より、変異型Cnp3タンパク質はセントロメアに対する結合能が低下している一方で、非セントロメア領域に取り込まれたCnp1と共局在し、その集積を安定化・増進しているものと推察した。その上で、野生型Cnp3タンパク質はCnp1の分布をセントロメアのみに制限するメカニズムの一翼を担うものと推論した。

本研究は、「CENP-Aヌクレオソームの分布制限」という新規機能を想定し、*cnp3-1*変異体を解析することで、この機能を担う分子メカニズムの一端を見出したものである。論文は終始首尾一貫性をもって記述されており、生命科学の理解や発展に寄与する新たな概念や発見を含んでいた。よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

(試問結果の要旨)

平成31年1月10日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。公聴会での発表は、本研究の結果と意義を明確に示すものであった。やや複雑な結果も平易に解説され、さらに、その後の質疑応答では、モデルの妥当性と将来展望について詳細な議論がなされ、申請者の当該分野における高い学識と考察力、さらに十分な研究経験を示すものであった。以上の結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日